

Virgínia Naide Silva

Efeito de altas temperaturas no crescimento e nas respostas fisiológicas ao estresse de juvenis de robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Vinicius Ronzani Cerqueira

Florianópolis/SC
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Virgínia Naide

Efeito de altas temperaturas no crescimento e nas respostas fisiológicas ao estresse de juvenis de robalo flecha (*Centropomus undecimalis*) / Virgínia Naide Silva ; orientador, Vinicius Ronzani Cerqueira - Florianópolis, SC, 2015.

57 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Piscicultura. 3. Choque térmico. 4. Hsp70, H3. 5. Tolerância térmica. I. Cerqueira, Vinicius Ronzani. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

**Efeito de altas temperaturas no crescimento e nas respostas fisiológicas
ao estresse de juvenis de robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*)**

Por

VIRGÍNIA NAIDE SILVA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura.



Prof. Alex Pires de Oliveira Nuñez, Dr.
Coordenador do Programa


Banca Examinadora:



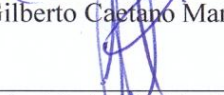
Dr. Vinicius Ronzani Cerqueira – *Orientador*



Dr. Evoy Zaniboni Filho - UFSC



Dr. Gilberto Caetano Manzoni - UNIVALI



Dr. José Luiz Pedreira Mouriño - UfSC

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus por ter me dado condições de lutar e alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, Naide e Manoel e minhas irmãs Susana e Viviane pelo exemplo, incentivo, amor e carinho que nunca me faltaram.

Ao meu namorado Alexandre pela convivência, apoio e atenção nos momentos alegres e tristes.

Aos meus amados sobrinhos Fernando e Manoela por nos presentear com as suas existências.

Obrigada por fazerem parte da minha vida e terem permanecido ao meu lado durante todo tempo desta conquista.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar presente em cada momento da minha vida, contemplando desde os detalhes mais simples até as conquistas mais gratificantes.

A minha mãe, meu pai, minhas irmãs, sobrinhos e cunhados, por serem os meus alicerces, as peças fundamentais para minha formação e vida.

Ao meu namorado Alexandre por todo amor e incentivo. Por me fazer acreditar todos os dias, que sou e posso ser melhor. Amo muito você!

À minha querida e amada amiga Beatriz, pela amizade e apoio. E também pela participação ativa nas minhas primeiras tentativas.

Ao meu orientador Dr. Vinicius Ronzani Cerqueira, com quem tive a honra de trabalhar por muitos anos, e que me ensinou muitas coisas.

A todos do laboratório de Piscicultura Marinha da UFSC (LAPMAR), que foram mais do que simples colegas de trabalho. Vocês acompanharam de perto toda caminhada, todo desespero, toda vitória. Caio, Fabíola, Bruna, Patrícia, Geovani, Murilo, Tim, Israel, Pedro. Em especial Salete, Cristina, Marcos, Manecas, Fábio, Gabriel, Valéria e Wanessinha, vocês foram essenciais para essa conquista. Obrigada pela amizade, atenção e dedicação!

Agradeço também a todos os membros do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (UFSC) por me receberem tão bem durante os 2 meses que estive por lá. Obrigada Prof. Evelise, Manu e Mari por todo ensinamento. Aprendi muito com vocês.

Ao Msc. Jacó do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI) que também abriu o seu laboratório para que eu pudesse fazer minhas análises de cortisol.

À Caroline Margonato da USP, que muito me ajudou sem mesmo me conhecer.

Ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade do aperfeiçoamento acadêmico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“O que não serve para a glória do meu
fim que não sirva para o
começo de minha decepção”

Manoel Indalécio Silva

RESUMO

Os efeitos de altas temperaturas (28, 31, 34 e 37 °C) sobre o crescimento, sobrevivência e respostas fisiológicas de juvenis de robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*) foram investigados nesse trabalho. Os tratamentos foram feitos em triplicatas e eram constituídos de quatro sistemas de recirculação independentes, cada um composto por três tanques de 150 L. Os animais (peso inicial de 3,4 g) criados durante 30 dias foram alimentados quatro vezes diariamente até a saciedade aparente. Além da biometria inicial realizaram-se mais duas biometrias, aos 15 e 30 dias de experimento. A composição centesimal dos peixes não sofreu influência dos tratamentos. Amostras de tecidos foram coletadas para análises de proliferação celular (fosfohistona H3) e estresse (glicose, cortisol e Hsp 70). De acordo com os resultados não houve relação entre o incremento de temperatura e a proliferação celular em brânquia e coração. Entre os tratamentos, não houve diferença significativa nos resultados dos parâmetros bioquímicos sanguíneos, cortisol e glicose. Já as respostas imuno-histoquímicas ao estresse térmico (Hsp 70) apresentaram diferenças significativas entre a temperatura mais alta e os outros tratamentos. A sobrevivência e os parâmetros zootécnicos foram afetados significativamente pela temperatura. O aumento da temperatura resultou em 71,3% de mortalidade dos animais criados a 37 °C. Os resultados sugerem que a temperatura ideal para a criação de juvenis de robalo-flecha está acima dos 28 °C e não deve ultrapassar os 34 °C. Tendo como base uma análise de regressão do ganho de peso, a temperatura mais adequada foi 31,9 °C.

Palavras chave: Aquicultura, piscicultura, choque térmico, hsp70, H3, tolerância térmica

ABSTRACT

The effects of high temperatures (28, 31, 34 and 37 °C) on growth, survive and physiological responses of common snook (*Centropomus undecimalis*) juveniles were investigated. Treatments were performed in triplicate and consisted of four independent recirculating systems, each comprised of three 150-L tanks. Animals (initial weight 3.4 ± 0.54 g) were reared for 30 days and fed a commercial diet four times a day to apparent satiation. Samples (for growth parameters and tissue collection) were taken at the beginning and after 15 and 30 days of the experiment. The proximate composition of the fish whole body was not influenced by the treatments. Tissue samples were collected for the analyses of cell proliferation (phosphohistone H3) and stress responses (glucose, cortisol and Hsp 70). Results showed no influence of increasing temperature and cell proliferation in gills and heart. Among the treatments, there was no significant difference in the results of blood biochemical parameters, cortisol and glucose. However, the immunohistochemical response to heat stress (Hsp 70) had significant differences between the highest temperature and the other treatments. Survival and growth parameters were significantly affected by temperature. Increasing temperature to 37 °C resulted in 71.3% of mortality. The overall results suggest that the ideal temperature for rearing common snook juveniles is above 28 °C and should not exceed 34 °C. Based on a regression analysis of weight gain, the most suitable temperature was 31.9 °C.

Keywords: Aquaculture, fish farming, thermal shock, hsp70, H3, thermal tolerance.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Dados de crescimento, sobrevivência e consumo de ração dos juvenis de robalo-flecha <i>Centropomus undecimalis</i> mantidos em diferentes temperaturas durante o período experimental (média \pm dp, n=3). | 39 |
| Tabela 2. Composição centesimal dos juvenis de robalo-flecha <i>Centropomus undecimalis</i> submetidos a diferentes temperaturas (média \pm dp, n=3). | 43 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Peso de juvenis de robalo-flecha *Centropomus undecimalis* criados em diferentes temperaturas (●:28 °C, ■:31 °C, ◆:34 °C e ▲:37 °C) durante 30 dias (média ± dp, n=3). a, b: Letras diferentes no mesmo dia indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos 37
- Figura 2. Relação entre o ganho de peso (g) e as diferentes temperaturas testadas (°C) com juvenis de robalo-flecha *Centropomus undecimalis* (média ± dp, n=3). 38
- Figura 3. Cortisol plasmático nos juvenis de robalo-flecha *Centropomus undecimalis*: (a) após 15 dias de experimento, e (b) após 30 dias de experimento (média ± dp). a, b: Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos. 23
- Figura 4. Níveis de Hsp70 em coração e brânquias dos juvenis de robalo-flecha *Centropomus undecimalis* criados em diferentes temperaturas. (a) Hsp70 em coração, coleta intermediária, (b) Hsp70 em coração, coleta final, (c) Hsp 70 em brânquias, coleta final. a, b: Letras diferente indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos. 41
- Figura 5. Níveis de H3 no coração e brânquias dos juvenis de robalo-flecha *Centropomus undecimalis* submetidos a diferentes temperaturas. (a) H3 no coração, coleta intermediária, (b) H3 no coração, coleta final, (c) H3 nas brânquias, coleta final..... 42

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 21 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 25 |
| 3. OBJETIVOS | 27 |
| 3.1. <i>Geral</i> | 27 |
| 3.2. <i>Específicos</i> | 27 |
| 4. ARTIGO CIENTÍFICO | 29 |
| Resumo..... | 29 |
| Abstract | 30 |
| 1. Introdução | 31 |
| 2. Material e métodos | 32 |
| 2.1. <i>Material biológico</i> | 32 |
| 2.2. <i>Delineamento experimental e sistema de cultivo</i> | 33 |
| 2.3. <i>Coleta de amostras</i> | 34 |
| 2.4. <i>Fixação de tecidos</i> | 34 |
| 2.5. <i>Análises de Hsp70 e H3</i> | 35 |
| 2.6. <i>Análises de Glicose e Cortisol</i> | 35 |
| 2.7. <i>Parâmetros de desempenho zootécnico</i> | 36 |
| 2.8. <i>Análises estatísticas</i> | 36 |
| 3. Resultados | 36 |
| 3.1. <i>Desempenho zootécnico</i> | 36 |
| 3.2. <i>Glicose e Cortisol</i> | 39 |
| 3.4 <i>Composição centesimal</i> | 42 |
| 4. Discussão | 43 |
| 5. Conclusão..... | 45 |
| Agradecimentos..... | 46 |
| Referências..... | 46 |
| 5. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL..... | 51 |

1. INTRODUÇÃO GERAL

A comunidade científica da Aquicultura tem desempenhado um papel fundamental na investigação de aspectos sobre o perfil biológico e manejo na criação, com o objetivo de desenvolver técnicas de cultivo para espécies variadas (COSTA FILHO et al., 2013). A escolha da espécie a ser cultivada exige atenção para algumas características como a aceitação no mercado, facilidade de adaptação, reprodução e engorda em cativeiro (ALVAREZ-LAJONCHÈRE et al., 2004). A engorda é uma etapa da criação caracterizada pelo crescimento, ou seja, pela transformação do corpo do animal, entre dois momentos num período de tempo (CARVALHO, 2006).

O crescimento de peixes em ambientes de cultivo pode sofrer intervenções de fatores bióticos e abióticos (MULLER, 2000) ou até mesmo, da ação conjunta desses. Essas intervenções são capazes de causar danos diretos no ganho de peso, gasto energético e sobrevivência desses animais (MOURAD, 2012).

A temperatura, por exemplo, é um fator abiótico que afeta o metabolismo dos peixes, tornando-se um dos mais importantes (JIAN et al., 2003) para os processos vitais. Cada espécie possui uma faixa de tolerância térmica, que geralmente é ampla, no entanto o crescimento é maximizado em uma temperatura considerada ideal dentro dessa faixa (BENDHACK, 2013; BERMUDEZ et al., 2010; JOBLING, 1997; KATERSKY e CARTER, 2005).

Animais criados em água com temperaturas abaixo ou acima do seu “ótimo” desviam energia com o objetivo de regular seus processos fisiológicos mantendo o equilíbrio com o meio, mas, conseqüentemente diminuem o crescimento (FRASCÁ-SCORVO et al., 2001; GOMES et al., 2000). Até um determinado ponto, o aumento de temperatura pode provocar o aumento metabólico (PÖRTNER, 2001), e a eficiência na absorção dos alimentos (OLIVEIRA et al., 2013). No entanto, o consumo de ração pode diminuir assim que as temperaturas ultrapassam a faixa de conforto ambiental. O que acontece, é que o peixe só consegue otimizar o consumo do alimento, liberando energia necessária ao crescimento somático e à proliferação celular, quando atinge a temperatura corpórea ideal (PIEDRAS et al., 2004).

A proliferação celular está associada ao aumento no número de células resultante da complementação do ciclo celular. Os fatores de crescimento (como hormônios, neurotransmissores e proteínas) estimulam esse processo (LEVINE et al., 1994). Algumas técnicas como

a imuno-histoquímica, que utiliza marcadores biológicos, são capazes de identificar proteínas que desempenham papel fundamental na atividade proliferativa de qualquer tecido. Como é o caso da proteína fosfohistona H3.

Estudos tem explorado o efeito da temperatura sobre o crescimento e sobrevivência de diversas espécies (ABBINK et al., 2011; HE et al., 2014; NYTRO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2013; SUN e CHEN, 2014). Até agora, nenhum mostrou o efeito de altas temperaturas na proliferação de células de peixe marinho, através de marcações de proteínas fosfohistonas H3.

A espécie *Centropomus undecimalis*, pertencente à família Centropomidae, é uma forte candidata para ser utilizada na piscicultura. Possui características favoráveis ao cultivo como carne de boa qualidade, valor econômico e aceitação no mercado consumidor (ALVAREZ-LAJONCHÈRE e TSUZUKI, 2008; TUCKER et al., 1985; TUCKER e JORY, 1991). Tucker (1987) relatou que o robalo-flecha (*C. undecimalis*) cultivado em condições ambientais favoráveis pode alcançar peso de 725 g em 15 meses. No ambiente natural a espécie chega a atingir um tamanho máximo entre 120 e 140 cm, pesando até 23 – 24 Kg (ALVAREZ-LAJONCHÈRE e TSUZUKI, 2008; TUCKER, 1987).

Todas as espécies do gênero *Centropomus* estão distribuídas ao longo do continente americano, em águas costeiras limitadas a 24 °C (MULLER, 2000; RIVAS, 1986). Na costa brasileira já foram relatadas até quatro espécies desse gênero, com predominância de *C. parallelus* (robalo-peva) e de *C. undecimalis* (robalo-flecha) (RIVAS, 1986).

O robalo-flecha é a espécie com a mais ampla distribuição dentro do gênero *Centropomus* (MULLER, 2000), é abundante nas regiões tropicais e também se encontra em águas subtropicais, distribuindo-se desde a costa da Flórida nos Estados Unidos até o Sul do Brasil (GILMORE et al., 1983; RIVAS, 1986).

É uma espécie carnívora (COSTA FILHO et al., 2013), eurihalina, podendo viver tanto no mar, em estuários marinhos, como em águas continentais (CORRÊA et al., 2010). E apesar de ser considerada rústica (ALVAREZ-LAJONCHÈRE e TSUZUKI, 2008; BARROSO et al., 2002; CERQUEIRA e TSUZUKI, 2009), é estenotérmica, ou seja, é sensível a grandes variações de temperatura (CARVALHO, 2006). As condições térmicas da água são determinantes para a sobrevivência e desempenho no cultivo de robalos (FERRAZ e CERQUEIRA, 2010; OSTINI et al., 2007).

De acordo com Tucker (1987), juvenis de robalo-flecha criados em água doce tem melhor crescimento em temperaturas entre 27-28 °C, alimentam-se bem entre 26 e 32 °C, e reduzem o apetite nas temperaturas abaixo desses valores. Segundo o autor, o mais adequado para a espécie é a sua criação em águas onde as temperaturas anuais permanecem acima dos 26 °C.

Para os juvenis de robalo-peva, a alimentação normal ocorre acima dos 20 °C, e a temperatura ótima para o crescimento está entre 25-30 °C (CERQUEIRA e TSUZUKI, 2009). De acordo com essas informações é possível constatar que baixa temperatura é sinônimo de baixa produtividade para esses animais.

A temperatura pode influenciar no desempenho e dinâmica biológica das espécies (PARRY et al., 2007). Qualquer evento que ocasione distúrbio térmico da água pode levar um peixe a uma situação estressante. O estresse é definido como um estado de ruptura da homeostasia (WENDELAAR BONGA, 1997), desencadeando várias respostas fisiológicas e comportamentais. Estudos clássicos têm observado a resposta dos organismos a agressões externas ao cultivo (BASU et al., 2002; CLARK e PECK, 2009; DUBEAU et al., 1998; IWAMA, 1998).

Animais submetidos a fatores estressantes recorrem a uma série de mudanças bioquímicas e fisiológicas (WENDELAAR BONGA, 1997). Essas mudanças podem estar relacionadas a adaptações do sistema neuroendócrino, caracterizado pelo aumento das concentrações de hormônios, tais como o cortisol (MOMMSEN et al., 1999; WENDELAAR BONGA, 2011), adaptações dos parâmetros do metabolismo energético, caracterizado pelas variações dos níveis de glicose no sangue (BRANDÃO et al., 2006); ou até mesmo a nível celular, através da síntese de proteínas específicas conhecidas como proteínas de choque térmico (Heat shock proteins, Hsp) (AIRAKSINEN et al., 2003; BASU et al., 2002; HIGHTOWER, 1991).

As Hsps são encontradas em todos os organismos, desde os mais primitivos como as bactérias, até os mais evoluídos como os homens (FEDER e HOFMANN, 1999; KREGEL, 2002; LODISH et al., 2003; MORIMOTO et al., 1990). Muitas famílias dessa proteína já foram identificadas, porém a mais estudada é a Hsp 70 que tem esse nome por possuir peso molecular de 70 kilodaltons (CARPENTER e HOFMANN, 2000; CLARK e PECK, 2009; MUKHOPADHYAY et al., 2003). A Hsp 70 tem função de chaperona celular, auxiliando na síntese ou destruição de outras proteínas (CLARK e PECK, 2009) e é a família

presente em maior número nos eucariotos. Existem duas formas dessa proteína, a forma constitutiva e a induzida (BASU, 2002; CLARK e PECK, 2009).

A forma constitutiva é aquela que está presente em quantidade basal, em células não estressadas, e atua como coadjuvante na formação de outras proteínas. (FINK e GOTO, 1998; HENDRICK e HARTL, 1993; HIGHTOWER, 1991; MORIMOTO et al., 1990). Ela atua na montagem de polipeptídeos nascentes: no dobramento (GEETHING e SAMBROOK, 1992), desmontagem ou decomposição biológica de proteínas desnaturadas (GEORGOPOULOS e WELCH, 1993; KIANG e TSOKOS, 1998; LINDQUIST e CRAIG, 1988). Já a forma induzida, ocorre quando os organismos são expostos a agentes estressores (QUENNEVILLE et al., 2002), particularmente aqueles que desnaturam proteínas (WELCH, 1993). O processo de multiplicação da Hsp induzida é um mecanismo de proteção celular adicional, importante na restauração da conformação nativa de proteínas desnaturadas (PELHAM, 1986).

As funções fisiológicas das proteínas de choque térmico em peixes tem grande importância como parte da resposta integrada às mudanças ambientais (BASU et al., 2003). A síntese dessas proteínas pode funcionar, por exemplo, como um mecanismo de defesa, aumento de resistência e adaptação ao calor. Nada mais é do que uma forma que o organismo encontra para compensar as condições que foram alteradas pelo agente estressor (HAHN et al, 1985; LI e HAHN, 1978; RUSSOTTI et al., 1996).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de temperaturas elevadas não só no crescimento e sobrevivência, como também nas respostas fisiológicas de proliferação celular (fosfohistona H3) e de estresse crônico (cortisol, glicose e Hsp 70) de juvenis de robalo-flecha *C. undecimalis* mantidos em sistema de recirculação durante 30 dias.

2. JUSTIFICATIVA

O Brasil é um país com uma imensa costa, que percorre dezessete estados, apresentando uma grande riqueza na fauna aquática e reunindo requisitos necessários para o desenvolvimento da aquicultura. Órgãos como a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), apostam que o país tem capacidade de atender a uma demanda crescente de pescado se tornando um dos maiores produtores do mundo até 2030 (MPA, 2014). Apesar de todo esse potencial, a piscicultura marinha brasileira ainda se encontra limitada a tentativas pontuais de criação e pesquisas, em busca de tecnologias para o cultivo comercial de espécies nativas.

Um dos fatores ambientais primordial para a criação de peixes é a temperatura da água, que afeta diretamente o metabolismo e interfere no desempenho zootécnico dos animais. Os estudos que abordam a influência da temperatura são cruciais para o desenvolvimento da piscicultura, considerando que existem grandes diferenças climáticas entre diversas regiões. A atuação dos fatores ambientais tem sido extensivamente estudada em peixes cultivados, deste modo, a fim de aperfeiçoar o cultivo de robalo-flecha, que é uma espécie tropical, e compensar a baixa produtividade que ocorre quando são criados em condições de água fria, tornou-se interessante testar o efeito de altas temperaturas no crescimento de juvenis. A criação de peixes em ambiente controlado com altas temperaturas pode ser uma alternativa interessante para regiões sub-tropicais, onde as condições naturais após o período reprodutivo (no verão) não são as ideais para o crescimento (abaixo de 25 °C).

3. OBJETIVOS

3.1. *Geral*

Avaliar o efeito de altas temperaturas (28, 31, 34 e 37 °C) no desempenho zootécnico, e nas respostas de proliferação celular e estresse fisiológico crônico em juvenis de robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*).

3.2. *Específicos*

- Determinar a melhor temperatura para o crescimento, a sobrevivência e a conversão alimentar de juvenis de robalo-flecha;
- Avaliar a composição centesimal corporal dos juvenis;
- Analisar a ocorrência de proliferação celular, através da expressão da proteína fosfohistona H3;
- Avaliar a ocorrência de estresse celular, através da expressão da proteína Hsp70;
- Avaliar o estresse individual, através dos níveis de glicose e cortisol.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo redigido nas normas do periódico *Aquaculture*.

Efeito de altas temperaturas no crescimento e nas respostas fisiológicas ao estresse de juvenis de robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*).

Virgínia N. Silva^a, Cristina Vaz Avelar de Carvalho^a, Fábio Carneiro Sterzelecki^a, Gabriel Passini^a, Manecas Baloi^a, Evelise Nazari^b, Vinicius Ronzani Cerqueira^a.

^aUniversidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Aquicultura, Laboratório de Piscicultura Marinha, Florianópolis, SC, CEP 88062-601, Brasil.

^bUniversidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal, Florianópolis, SC, CEP 88040-900, Brasil.

Resumo

Os efeitos de altas temperaturas (28, 31, 34 e 37 °C) sobre o crescimento, sobrevivência e respostas fisiológicas de juvenis de robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*) foram investigados nesse trabalho. Os tratamentos foram feitos em triplicatas e eram constituídos de quatro sistemas de recirculação independentes, cada um composto por três tanques de 150 L. Os animais (peso inicial de 3,4 g) criados durante 30 dias foram alimentados quatro vezes diariamente até a saciedade aparente. Além da biometria inicial realizaram-se mais duas biometrias, aos 15 e 30 dias de experimento. A composição centesimal dos peixes não sofreu influência dos tratamentos. Amostras de tecidos foram coletadas para análises de proliferação celular (fosfohistona H3) e estresse (glicose, cortisol e Hsp 70). De acordo com os resultados não houve relação entre o incremento de temperatura e a proliferação celular em brânquia e coração. Entre os tratamentos, não houve diferença significativa nos resultados dos parâmetros bioquímicos sanguíneos, cortisol e glicose. Já as respostas imuno-histoquímicas ao estresse térmico (Hsp 70) apresentaram diferenças significativas entre a temperatura mais alta e os outros tratamentos. A sobrevivência e os

parâmetros zootécnicos foram afetados significativamente pela temperatura. O aumento da temperatura resultou em 71,3% de mortalidade dos animais criados a 37 °C. Os resultados sugerem que a temperatura ideal para a criação de juvenis de robalo-flecha está acima dos 28 °C e não deve ultrapassar os 34 °C. Tendo como base uma análise de regressão do ganho de peso, a temperatura mais adequada foi 31,9 °C.

Palavras chave: piscicultura, choque térmico, hsp70, H3, tolerância térmica.

Abstract

The effects of high temperatures (28, 31, 34 and 37 °C) on growth, survive and physiological responses of common snook (*Centropomus undecimalis*) juveniles were investigated. Treatments were performed in triplicate and consisted of four independent recirculating systems, each comprised of three 150-L tanks. Animals (initial weight 3.4 ± 0.54 g) were reared for 30 days and fed a commercial diet four times a day to apparent satiation. Samples (for growth parameters and tissue collection) were taken at the beginning and after 15 and 30 days of the experiment. The proximate composition of the fish whole body was not influenced by the treatments. Tissue samples were collected for the analyses of cell proliferation (phosphohistone H3) and stress responses (glucose, cortisol and Hsp 70). Results showed no influence of increasing temperature and cell proliferation in gills and heart. Among the treatments, there was no significant difference in the results of blood biochemical parameters, cortisol and glucose. However, the immunohistochemical response to heat stress (Hsp 70) had significant differences between the highest temperature and the other treatments. Survival and growth parameters were significantly affected by temperature. Increasing temperature to 37 °C resulted in 71.3% of mortality. The overall results suggest that the ideal temperature for rearing common snook juveniles is above 28 °C and should not exceed 34 °C. Based on a regression analysis of weight gain, the most suitable temperature was 31.9 °C.

Keywords: fish farming, thermal shock, hsp70, H3, thermal tolerance.

Endereço para correspondência. Rua Beco dos Coroas s/n, Barra da Lagoa, Florianópolis, SC, Brasil. Tel. +55 48 37214793
Endereço de e-mail: virginia.eng.aqi@gmail.com

1. Introdução

O crescimento de peixes sofre a interferência de fatores bióticos e abióticos, porém a temperatura talvez seja o fator mais estudado, já que os peixes têm seu desenvolvimento altamente dependente dessa variável ambiental (Tucker, 1987). Alterações na temperatura podem atuar tanto no comportamento, quanto nas atividades bioquímicas e fisiológicas dos animais (Cao et al., 2007). A velocidade dos processos metabólicos é alterada em função das mudanças térmicas (Baldiasserotto, 2010).

Os efeitos dessas mudanças são espécie-específicos (Bermudes et al., 2010; Schmidt-Nielsen, 1997). Ainda que exista uma aceleração do metabolismo proporcional ao aquecimento da água (Baldiasserotto, 2010), os animais só crescem quando atingem uma temperatura corpórea ideal para a espécie (Jobling, 1997; Piedras et al., 2004). Nas condições favoráveis, eles deixam de dispendar energia tentando regular seus processos fisiológicos com o meio (Gomes et al., 2000), e ainda conseguem otimizar o consumo de alimento, liberando assim, energia necessária à multiplicação celular e ao crescimento (Piedras et al., 2004).

Ao saírem da faixa de tolerância térmica, mudam o comportamento, em resposta a uma limitação metabólica, ou entram em estado de estresse (Piedras et al., 2004). Animais submetidos a fatores estressantes recorrem a uma série de mudanças bioquímicas e fisiológicas comuns (Wendelaar Bonga, 1997). Essas mudanças podem estar relacionadas a adaptações do sistema neuroendócrino, caracterizado pelo aumento das concentrações de hormônios, tais como o cortisol (Mommensen et al., 1999; Wendelaar Bonga, 2011), adaptações dos parâmetros do metabolismo energético, como os níveis de glicose no sangue (Brandão et al., 2006) ou até mesmo a nível celular, através da síntese de proteínas específicas conhecidas como proteínas de choque térmico (Heat shock proteins, Hsp) (Airaksinen et al., 2003; Basu et al., 2002; Hightower, 1991).

O robalo flecha é a espécie com a distribuição geográfica mais ampla dentro do gênero *Centropomus*. Encontra-se em águas tropicais e subtropicais, distribuindo-se desde a costa da Flórida, nos Estados

Unidos, até o Sul do Brasil (Gilmore et al., 1983; Rivas, 1986). A espécie é uma forte candidata para a piscicultura marinha, por possuir características favoráveis ao cultivo e aceitação no mercado consumidor (Alvarez-Lajonchère e Tsuzuki, 2008; Tucker, 1987; Souza-Filho e Cerqueira, 2003). Nos locais em que é pescado, sua carne é considerada nobre, e por isso, desfruta de alto valor comercial (Tucker e Jory, 1991). Por ser uma espécie tropical, o desempenho e a sobrevivência de robalos em ambientes de cultivo são inteiramente dependentes das condições térmicas da água (Cerqueira, 2005; Liebl et al., 2016; Ostini et al., 2007). Em um trabalho mais recente, que testou salinidade e temperatura (Mello et al., 2014), observou-se que a temperatura de 28 °C foi mais adequada que 25 °C para o crescimento de juvenis.

É possível que peixes considerados tropicais sejam resistentes a elevações de temperatura mais importantes do que tem sido testado até agora em pesquisas feitas na Aquicultura. Um exemplo é o robalo-asiático, *Lates calcarifer* (Bermudes et al., 2010; Katersky and Carter, 2005).

Até o momento não foram feitos estudos sobre o efeito de temperaturas elevadas com o robalo-flecha. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos de altas temperaturas (acima de 28 °C) não só no crescimento e na sobrevivência, como também nas respostas fisiológicas de proliferação celular (fosfohistona H3) e de estresse crônico (cortisol, glicose e Hsp 70) de juvenis desta espécie, estabelecendo limiares térmicos máximos para a sua criação.

2. Material e métodos

2.1. Material biológico

Os procedimentos realizados com os peixes durante todo o trabalho foram feitos seguindo a metodologia aprovada pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) – UFSC (Protocolo nº PP0861). Foram utilizados juvenis de robalo-flecha *Centropomus undecimalis* com idade de 3 meses, provenientes de reprodução artificial realizada no próprio laboratório (Passini et al., 2013). Antes do início do experimento os peixes estavam em um tanque de 4000 L em fluxo contínuo de água, salinidade de 34; temperatura de 28 °C; fotoperíodo 10L:14E e alimentação diária até a saciedade aparente.

2.2. *Delineamento experimental e sistema de cultivo*

No início do experimento os juvenis foram pesados ($3,4 \pm 0,54$ g) e medidos ($7,7 \pm 0,40$ cm) individualmente, e distribuídos em 12 tanques de fibra de vidro com volume útil de 150 L, sendo que em cada tanque foram estocados 36 peixes ($0,82$ g L⁻¹). Cada tratamento foi constituído de um sistema de recirculação independente, composto por três tanques conectados a um sistema de tratamento de água, contendo um filtro de 50 µm, fracionador de espuma, filtro biológico, e ultravioleta (UV), além de uma bomba submersa para o retorno da água.

O delineamento experimental foi de quatro tratamentos em triplicata, sendo que em cada tratamento foi testada uma temperatura: 28 °C, 31 °C, 34 °C e 37 °C. A temperatura da água inicial dos tanques era de 28 °C e foi ajustada em 1,0 °C por dia até alcançar o valor desejado em cada tratamento. Depois de 10 dias todos os peixes estavam em águas com suas temperaturas experimentais controladas por aquecedores com termostatos individuais. A temperatura foi registrada duas vezes por dia com um termômetro de mercúrio com precisão de 0,1 °C (L338/07, INCOTERM, Brasil). Os valores observados (mínimo; máximo; média \pm dp) para cada tratamento foram: 28 °C (27,2 °C; 29,5 °C; $28,13 \pm 0,01$ °C), 31 °C (30,2 °C; 31,9 °C; $31,09 \pm 0,02$ °C), 34 °C (32,5 °C; 34,9 °C; $33,92 \pm 0,01$ °C) e 37 °C (36,5 °C; 37 °C; $36,94 \pm 0,03$ °C).

O oxigênio dissolvido e a salinidade foram monitorados diariamente. Uma vez por semana eram realizadas análises de pH, amônia total, nitrito e nitrato.

O oxigênio em todos os tanques foi mantido em $6,36 \pm 0,30$ mg L⁻¹, o pH em $8,09 \pm 0,21$, a amônia em $0,06 \pm 0,03$ mg L⁻¹, o nitrato em $6,47 \pm 0,66$ mg L⁻¹ e o nitrito em $0,32 \pm 0,05$ mg L⁻¹. A salinidade se manteve em $34,2 \pm 0,1$ e o fotoperíodo foi de 10L:14E.

Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia (8 h 30 min, 11 h 30 min, 14 h 30 min e 17 h 30 min) com uma dieta comercial (NRD 1,2 mm, INVE Aquaculture, Bélgica), até a saciedade aparente. A ração era pesada diariamente e fornecida para cada tanque de forma individual. O experimento teve duração de 30 dias e além da biometria inicial foram realizadas mais duas biometrias de todos os peixes (uma intermediária e uma final), avaliando o peso médio (precisão de 0,01 g) e comprimento total (precisão de 0,1 cm).

2.3. Coleta de amostras

No início do experimento, 120 g de peixes (35 indivíduos) do tanque de 4.000 L, foram sacrificados com uma overdose de benzocaína (400 mg L^{-1}) e congelados para análise inicial de composição centesimal, realizada no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LABNUTRI) da Universidade Federal de Santa Catarina.

As análises de matéria seca, proteína bruta, extrato etéreo e matéria mineral seguiram as normas da Association of Official Analytical Chemist (AOAC, 1999). A matéria seca foi obtida através de secagem a 105°C , a matéria mineral por incineração a 550°C , a gordura por extração em éter (após a hidrólise ácida) e a proteína bruta pelo método de Kjeldahl ($N \times 6,25$), após digestão ácida.

Durante a biometria intermediária, com 15 dias de experimento, foram amostrados cinco indivíduos de cada tanque. Os peixes foram anestesiados e amostras de sangue foram coletadas por punção do vaso caudal utilizando-se seringas, para as análises de cortisol e glicose. Posteriormente os peixes foram sacrificados e o coração foi dissecado para as análises imuno-histoquímicas de proteínas Hsp70 (proteína de choque térmico) e fosfohistona H3 (proteína de proliferação celular).

Ao final do período experimental (30 dias) foi feita a biometria de todos os peixes e foram coletadas amostras de sangue para as análises de glicose e cortisol. Posteriormente, todos os peixes foram sacrificados com overdose de benzocaína (400 mg L^{-1}), sendo que de 3 peixes de cada tanque foram coletados o coração e o segundo arco branquial para as análises de Hsp70 e H3. O peixes restantes foram congelados para as análises de composição centesimal.

2.4. Fixação de tecidos

As amostras de brânquias e corações foram fixadas em paraformaldeído 4% por 24 h e transferidas para solução tampão fosfato 0,2 M e pH 7,4, permanecendo na geladeira até o processamento. Após os processos de desidratação, diafanização, inclusão em parafina e formação de blocos, o material foi cortado em micrótomo rotativo a uma espessura de $6 \mu\text{m}$, e distribuídos em lâminas previamente gelatinizadas. Cada lâmina continha os quatros tratamentos dispostos em fileiras. Algumas dessas lâminas foram destinadas ao método dicrômico de

coloração (HE) para controle histológico, que visa evidenciar a qualidade da preparação histológica.

2.5. Análises de Hsp70 e H3

As lâminas histológicas foram destinadas a marcações celulares por imuno-histoquímica para as finalidades de: reconhecimento das proteínas envolvidas na identificação do estresse térmico (anticorpo anti-Hsp70) e na identificação das células em proliferação celular (anticorpo anti-fosfohistona H3). As secções histológicas foram desparafinizadas, hidratadas e posteriormente submetidas a um banho de 15 min de peróxido de hidrogênio 10% em metanol (1 : 2) no escuro para o bloqueio das peroxidases endógenas; em seguida as lâminas foram lavadas duas vezes por 5 min PBS 1M (pH 7,4), seguida de um banho de 15 min em tampão PBS + Triton X- 100® a 0,3% para a permeabilização das membranas. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado com soro fetal bovino (SFB, do inglês *bovine fetal serum*) a 5% com tampão PBS-Triton X-100® a 0,1% por 40 min, seguido da incubação com anticorpo primário durante 12 h a 4 °C. Decorrido este tempo, as secções foram lavadas três vezes em tampão PBS Triton X-100® a 0,3% por 10 min e incubadas com anticorpo secundário correspondente em temperatura ambiente e lavadas em tampão PBS Triton X-100® a 0,1%. Por fim, as secções destinadas para análises colorimétricas em microscopia de luz foram tratadas com solução de 3-3'- diaminobenzidina (DAB - Sigma Chemical) diluído em PBS + peróxido de hidrogênio a 10%. Ao final, as secções seguiram para desidratação em série etanólica crescente, diafanizadas em xilol e as lâminas finalizadas com meio de montagem Entellan® - Merck.

A quantificação das células positivas na análise por imuno-histoquímica foi realizada através do método estereológico, utilizando a Gratícula de Weibel nº 2 – M42 acoplada ao microscópio óptico (400 x) (Mandarim-de-Lacerda, 2003).

2.6. Análises de Glicose e Cortisol

Após a coleta de sangue por punção do vaso caudal, uma alíquota do material foi imediatamente inserida em fita reagente para determinação da glicose, usando um glicosímetro digital (OneTouch

Ultra, Johnson & Johnson, Brasil). O restante do sangue era transferido para tubos Eppendorf, centrifugado a 6000 RPM durante 10 min, e o plasma utilizado para a quantificação do cortisol sanguíneo, utilizando um kit comercial de análise imunoenzimática (EIA-1887, DRG International, EUA).

2.7. Parâmetros de desempenho zootécnico

Os seguintes parâmetros foram avaliados: sobrevivência (%), ganho em peso (GP = peso final - peso inicial), taxa de crescimento específico: $TCE = 100[(\ln \text{ peso final médio} - \ln \text{ peso inicial médio})/\text{tempo}]$, Coeficiente de variação do peso (%) = $100 \times (\text{desvio padrão}/\text{média peso})$ e Índice de conversão alimentar (ICA = consumo de ração/ganho de peso).

2.8. Análises estatísticas

O tratamento estatístico dos dados foi feito através da análise de variância (ANOVA uni-fatorial), seguida do teste de Tukey. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. Aplicou-se a análise de regressão polinomial de segunda ordem para avaliar o efeito das diferentes temperaturas sobre o ganho em peso dos peixes. O nível de significância adotado foi de 5%. Os valores médios obtidos são apresentados com o desvio padrão (média \pm dp).

3. Resultados

3.1. Desempenho zootécnico

A sobrevivência foi afetada pela temperatura da água (Tabela 1). A média dos animais mantidos a 28, 31 e 34 °C ficou entre 99,1 e 100%, entretanto para aqueles cultivados a 37 °C foi observada uma mortalidade de 71,3%. A mortalidade ocorreu de forma ininterrupta durante 14 dias, começando na primeira semana após a biometria intermediária e continuando até o último dia de experimento (do 17° até o 30° dia).

A temperatura também afetou de forma significativa o crescimento (Tabela 1). Animais cultivados a 31 °C tiveram as maiores taxa de crescimento específico (TCE = $2,63 \pm 0,61\%$ dia⁻¹) nos primeiros 15 dias, quando comparados aos peixes cultivados nas demais temperaturas. No final do experimento os tratamentos 31 e 34 °C não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) com TCE de $3,50 \pm 0,69$ e $3,46 \pm 0,73\%$ dia⁻¹, respectivamente. Após os 30 dias de experimento, os menores valores de TCE foram encontrados nos peixes mantidos na temperatura de 37 °C ($1,00 \pm 0,53\%$ dia⁻¹). Os resultados de peso final não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos 28 e 37 °C, e entre os tratamentos 31 e 34 °C (Figura 1).

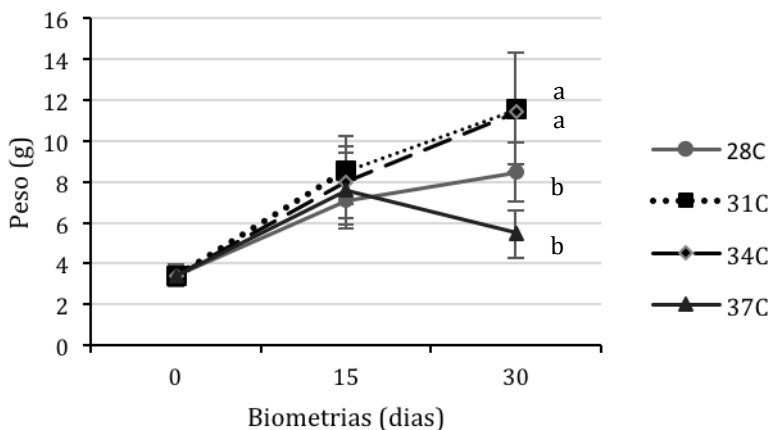


Figura 1. Peso de juvenis de robalo-flecha *Centropomus undecimalis* criados em diferentes temperaturas (●:28 °C, ■:31 °C, ◆:34 °C e ▲:37 °C) durante 30 dias (média \pm dp, n=3). a, b: Letras diferentes no mesmo dia indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos.

A relação do ganho de peso com as diferentes temperaturas foi descrita pelo modelo de regressão polinomial de segunda ordem, onde a temperatura ótima para o cultivo do robalo para o máximo ganho de peso durante o experimento foi estimada em 31,91 °C (Figura 2).

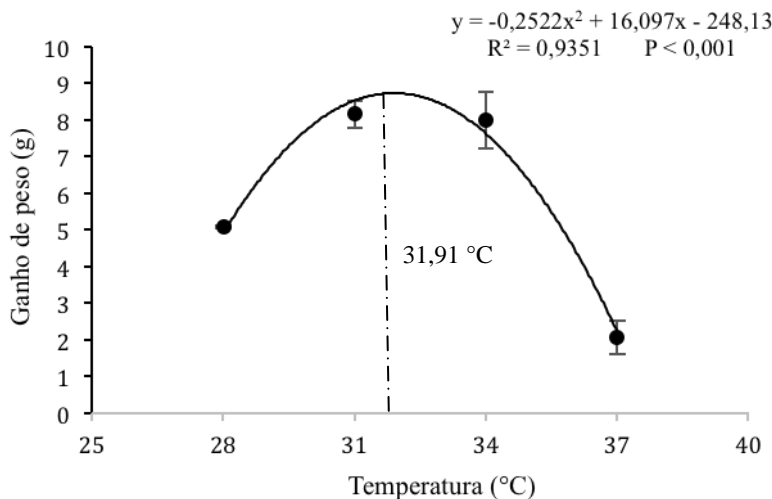


Figura 2. Relação entre o ganho de peso (g) e as diferentes temperaturas testadas (°C) com juvenis de robalo-flecha *Centropomus undecimalis* (média \pm dp, n=3).

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos com relação ao índice de conversão alimentar (ICA) na biometria intermediária, mas no final os peixes cultivados na temperatura de 37 °C apresentaram valor significativamente superior ($P < 0,05$) a todos os outros tratamentos (Tabela 1).

O tratamento de 28 °C apresentou o menor coeficiente de variação em peso ($16,7 \pm 0,35\%$) nos primeiros 15 dias de experimento, porém esses valores foram modificados nos 15 dias subsequentes. Ao final do período experimental, os dados de CV em peso não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos.

Tabela 1. Dados de crescimento, sobrevivência e consumo de ração dos juvenis de robalo-flecha *Centropomus undecimalis* mantidos em diferentes temperaturas durante o período experimental (média \pm dp, n=3).

| | 28 | 31 | 34 | 37 |
|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Amostragem | 15º dia de experimento | | | |
| Sobrevivência (%) | 100,00 \pm 0,00 ^a | 100,00 \pm 0,00 ^a | 100,00 \pm 0,00 ^a | 100,00 \pm 0,00 ^a |
| Comprimento final (cm) | 9,22 \pm 0,51 ^b | 9,88 \pm 0,76 ^{ab} | 10,20 \pm 0,73 ^a | 9,82 \pm 0,83 ^{ab} |
| TCE (% dia ⁻¹) | 2,10 \pm 0,50 ^c | 2,63 \pm 0,61 ^a | 2,43 \pm 0,60 ^b | 1,84 \pm 0,59 ^d |
| CV peso(%) | 16,7 \pm 0,35 ^b | 19,5 \pm 0,94 ^{ab} | 20,37 \pm 2,6 ^{ab} | 23,6 \pm 2,28 ^a |
| ICA | 0,74 \pm 0,01 ^a | 0,67 \pm 0,05 ^a | 0,74 \pm 0,03 ^a | 0,78 \pm 0,08 ^a |

| | 28 | 31 | 34 | 37 |
|----------------------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Amostragem | 30º dia de experimento | | | |
| Sobrevivência (%) | 100,00 \pm 0,00 ^a | 97,07 \pm 1,31 ^a | 100,00 \pm 0,00 ^a | 28,70 \pm 4,72 ^b |
| Comprimento final (cm) | 9,95 \pm 0,51 ^b | 11,57 \pm 0,38 ^a | 11,40 \pm 0,18 ^a | 9,37 \pm 0,37 ^b |
| TCE (% dia ⁻¹) | 2,63 \pm 0,54 ^b | 3,50 \pm 0,69 ^a | 3,46 \pm 0,73 ^a | 1,00 \pm 0,53 ^c |
| Ingestão alimentar (g) | 141,39 \pm 1,00 ^b | 194,53 \pm 26,53 ^{ab} | 197,64 \pm 13,68 ^a | -- |
| CV peso(%) | 17,05 \pm 0,49 | 23,3 \pm 0,62 | 24,37 \pm 2,36 | 16,25 \pm 7,99 |
| ICA | 0,78 \pm 0,01 ^a | 0,67 \pm 0,04 ^a | 0,69 \pm 0,03 ^a | -- |

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos.

3.2. Glicose e Cortisol

O valor inicial de glicose (104,3 \pm 26,04 mg dL⁻¹) foi significativamente superior ao de todos os tratamentos na coleta intermediária (28 °C = 51,63 \pm 13,78; 31 °C = 52,71 \pm 16,51; 34 °C = 52,43 \pm 18,36 e 37 °C = 70,89 \pm 18,98). Entretanto, os tratamentos não diferiram entre si. Na coleta final não houve diferença significativa entre os tratamentos 28, 31 e 34 °C. O tratamento 37 °C não tinha peixes suficientes para a coleta de dados.

Houve diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os níveis de cortisol plasmático nos primeiros 15 dias (Figura 3a). Porém, ao final do experimento não havia diferença significativa entre os tratamentos 28, 31 e 34 °C (Figura 3b). O tratamento 37 °C não tinha material biológico suficiente para a coleta de amostras.

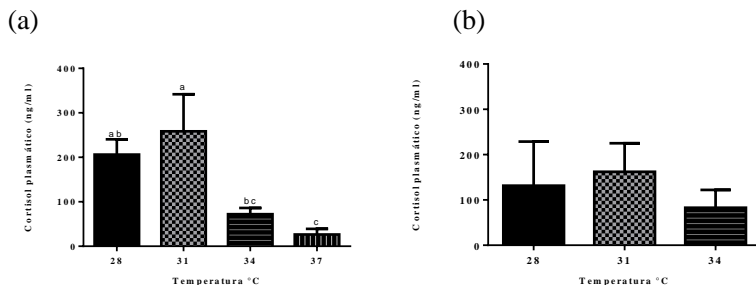


Figura 3. Cortisol plasmático nos juvenis de robalo-flecha *Centropomus undecimalis*: (a) após 15 dias de experimento, e (b) após 30 dias de experimento (média \pm dp). a, b: Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos.

3.3 Hsp70 e H3

Na coleta intermediária, foram encontradas diferenças significativas entre os níveis de Hsp70 em coração (Figura 4a). Ao final do experimento, as marcações de Hsp70, em brânquias e coração, no tratamento de 37 °C teve quantidade significativamente superior ($P < 0,05$) aos demais tratamentos. (Figura 4b e c).

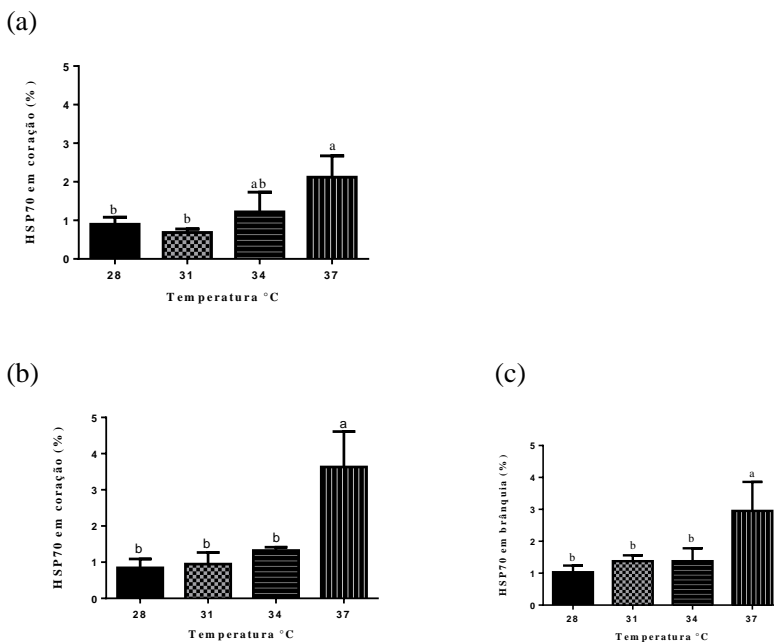
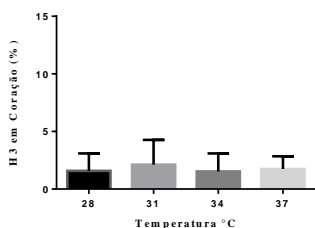


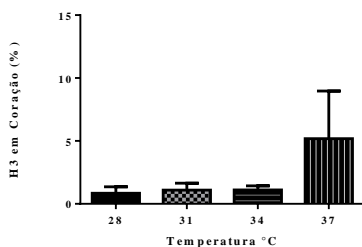
Figura 4. Níveis de Hsp70 em coração e brânquias dos juvenis de robalo-flecha *Centropomus undecimalis* criados em diferentes temperaturas. (a) Hsp70 em coração, coleta intermediária, (b) Hsp70 em coração, coleta final, (c) Hsp 70 em brânquias, coleta final. a, b: Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos.

Para a proteína H3, não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre as marcações celulares em brânquias e coração nas coletas intermediária e final (Figura 5).

(a)



(b)



(c)

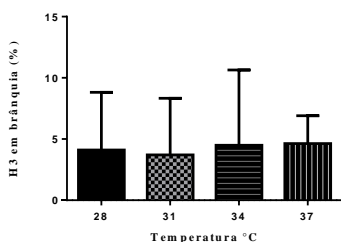


Figura 5. Níveis de H3 no coração e brânquias dos juvenis de robalo-flecha *Centropomus undecimalis* submetidos a diferentes temperaturas. (a) H3 no coração, coleta intermediária, (b) H3 no coração, coleta final, (c) H3 nas brânquias, coleta final.

3.4 Composição centesimal

Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos de 28, 31 e 34 °C com relação a umidade, proteína bruta,

lipídeos e cinzas (Tabela 2). O tratamento 37 °C não tinha material biológico suficiente ao final do experimento para a realização da análise. Tabela 2. Composição centesimal dos juvenis de robalo-flecha *Centropomus undecimalis* submetidos a diferentes temperaturas (média \pm dp, n=3).

| Temperatura (°C) | Umidade (%) | Proteína bruta (%) | Lipídeos (%) | Cinzas (%) |
|------------------|------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| Inicial | 71,81 | 17,48 | 6,34 | 4,27 |
| 28 | 70,44 \pm 0,18 | 18,12 \pm 0,66 | 6,71 \pm 0,75 | 4,94 \pm 0,42 |
| 31 | 69,79 \pm 0,59 | 18,17 \pm 0,74 | 7,29 \pm 0,16 | 4,70 \pm 0,31 |
| 34 | 69,67 \pm 0,77 | 18,89 \pm 0,34 | 6,97 \pm 0,25 | 5,21 \pm 0,57 |

4. Discussão

Muitos trabalhos já relataram sobre a tolerância térmica de peixes, e usualmente focam em determinar a faixa de temperatura letal ou ótima de crescimento (Abbink et al., 2011; Bendhack et al., 2013; He et al., 2014; Nytro et al., 2014). A temperatura é o fator externo mais importante que afeta os processos metabólicos, e normalmente é capaz de influenciar as taxas de crescimento (Imsland et al., 2006; Jobling, 1997).

Existe uma limitação no crescimento de peixes cultivados em temperaturas extremamente altas que é típica de todas as espécies para as quais a tolerância a altas temperaturas já foram estudadas (Abbink et al., 2011; Bermudes et al., 2010; Björnsson et al., 2001; Imsland et al., 2006). Geralmente a taxa de crescimento aumenta com a temperatura e atinge o melhor resultado na temperatura ótima, mas assim que esse aumento ultrapassa a faixa de conforto térmico do animal ocorre um rápido declínio no desempenho (Bermudes et al., 2010; Nytro et al., 2014). Nesse trabalho não foi diferente, os resultados mostraram que o crescimento dos juvenis de robalo foi influenciado pela temperatura da água, indicando um maior potencial de crescimento para os juvenis criados nas temperaturas 31 e 34 °C, que apresentaram médias de peso final duas vezes maiores do que os cultivados na temperatura mais alta (37 °C), em apenas 30 dias de cultivo.

Os resultados também mostraram que apesar do consumo e da taxa de crescimento específico serem melhores nas temperaturas 31 e 34 °C, a conversão alimentar não apresentou diferenças entre 28 e 34 °C. Resultados semelhantes foram encontrados por Bermudes et al. (2010) e Katersky and Carter (2005) que observaram maior consumo e taxa de

crescimento dos juvenis de *Lates calcarifer* nas temperaturas ótimas (33 e 36 °C), porém a conversão alimentar foi igual para a temperatura abaixo do intervalo ótimo (27 °C) até a maior temperatura considerada ideal (36 °C). Isso confirma a hipótese de que nos peixes, a temperatura ótima para o crescimento não está necessariamente associada ao consumo de ração (Bermudes et al., 2010).

De acordo com os resultados encontrados no presente trabalho, podemos afirmar que a temperatura de criação dos juvenis de robalo-flecha não deve ultrapassar os 34 °C. Segundo He et al. (2014), qualquer aumento ou diminuição na temperatura pode influenciar no comportamento e nas atividades bioquímicas e fisiológicas dos peixes. Na aquicultura a temperatura máxima crítica geralmente é enfatizada por ser um indicador de tolerância térmica que permite a identificação da temperatura na qual ocorrem os primeiros sinais de estresse. A redução no consumo de ração, por exemplo, pode estar relacionada a um estado de estresse térmico (Bermudes et al., 2010; Imsland et al., 2006). No presente trabalho, observou-se a supressão do apetite dos animais na temperatura mais alta, que começou a ocorrer no 17º dia após a primeira biometria. Essa perda de apetite também foi relatada em *Lates calcarifer* cultivados em temperaturas extremamente altas como 38 e 39 °C (Bermudes et al., 2010; Katersky and Carter, 2005). Já em *Cyclopterus lumpus* (L.) cultivados em temperaturas consideradas altas para a espécie (13 e 16 °C), a manifestação do estresse foi associada com a ocorrência de cataratas e posteriormente com a morte dos peixes (Nytrø et al., 2014).

As marcações celulares da proteína de choque térmico Hsp70, sugerem a influência da alta temperatura sobre o estado de estresse dos animais. No presente trabalho foi observada uma relação direta entre a resposta celular ao estresse (Hsp70) e a resposta neuroendócrina, como descrito por Basu et al. (2001). Durante a coleta intermediária a concentração de Hsp70 na célula teve relação inversa com o nível de cortisol presente no plasma sanguíneo. Os níveis baixos de cortisol amplificaram as quantidades de Hsp70 nas temperaturas de 34 e 37 °C, enquanto os níveis altos de cortisol suprimiram a Hsp70 em 28 e 31 °C. Esses baixos níveis de cortisol nas temperaturas mais altas, nos primeiros quinze dias de experimento, sugerem uma exaustão ou descompensação do organismo, que começou a acontecer quando ele não conseguia mais se adaptar (Selye, 1936). Porém, pelos resultados, foi possível perceber o restabelecimento dos peixes criados a 34 °C, que ao final do experimento apresentaram os melhores resultados

zootécnicos, junto com os criados a 31 °C. Esse ajuste, considerado compensatório, pode ocorrer em intervalos de tempo que vão desde frações de segundo até mais de um mês. Segundo He et al. (2014), as respostas, tanto comportamentais como fisiológicas ao desequilíbrio térmico, podem ser reversíveis ou irreversíveis.

A resposta do Hsp70 em peixes é considerada específica para cada tecido (Currie, 2011) e resultados discrepantes podem ser encontrados em tecidos diferentes do mesmo animal. Porém, no presente trabalho não foram encontradas diferenças nos tecidos do coração e brânquias em diferentes temperaturas.

Para a resposta imuno-histológica de proliferação celular (H3), não foi encontrada relação entre as diferentes temperaturas. Os fatores de crescimento ou sinalizadores moleculares estavam presentes nos tecidos (brânquias e coração), porém não foi possível estabelecer uma relação entre os tratamentos e a velocidade de proliferação das células.

A temperatura também pode afetar a qualidade nutricional dos pescados. Essas características são altamente dependentes da composição bioquímica do peixe (Grigorakis, 2007). Porém no presente estudo as diferentes temperaturas não influenciaram nas porcentagens de umidade, proteína bruta, cinzas e lipídios nas carcaças dos juvenis de robalo-flecha.

A maior contribuição para a diferença da temperatura “ótima” entre estudos com a mesma espécie é o tamanho do animal (Abbink et al., 2011). As temperaturas para o crescimento e sobrevivência podem mudar junto com a mudança no tamanho (Handeland et al., 2008). Existe uma redução na temperatura ótima com o crescimento do peixe, geralmente os juvenis preferem águas mais quentes do que os adultos da mesma espécie (Björnsson et al., 2001; Jobling, 1997; He et al., 2014). Nytro et al. (2014) puderam observar a significância da interação entre temperatura e tamanho do peixe, nos dois anos de experimento (2012 e 2013), com grupos de 6,2 e 26,5 g de juvenis de *Cyclopterus lumpus* (L.). Com base na regra de redução de temperatura ideal com o aumento do tamanho, seria interessante realizar novos estudos para determinar a temperatura ideal para o robalo-flecha em outras faixas de tamanho.

5. Conclusão

A temperatura de 37 °C resultou em excesso (71,3%) de mortalidade. As temperaturas em que os peixes tiveram melhor

desempenho (31 e 34 °C) coincidiram com baixos valores de Hsp70. Os resultados sugerem que a temperatura ideal para a criação de juvenis de robalo-flecha está acima dos 28 °C e não deve ultrapassar os 34 °C. Tendo como base uma análise de regressão do ganho de peso, a temperatura mais adequada foi 31,9 °C.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Ministério da Pesca e Aquicultura, que financiaram o projeto “Desenvolvimento de tecnologias de produção de robalo-flecha e bijupirá em Santa Catarina” da Chamada nº 42/2012 - Linha II - Aquicultura (Processo nº 406844/2012-7).

Referências

Abbink, W., Garcia, A. B., Roques, J. A., Partridge, G. J., Kloet, K., Schneider, O., 2011. The effect of temperature and pH on the growth and physiological response of juvenile yellowtail kingfish *Seriola lalandi* in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture* 330, 130-135.

Airaksinen, S., Råbergh, C. M., Lahti, A., Kaatrasalo, A., Sistonen, L., Nikinmaa, M., 2003. Stressor-dependent regulation of the heat shock response in zebrafish, *Danio rerio*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 134, 839-846.

Alvarez-Lajonchère, L., Tsuzuki, M. Y., 2008. A review of methods for *Centropomus spp.* (snooks) aquaculture and recommendations for the establishment of their culture in Latin America. *Aquaculture Research* 39, 684-700.

Baldisserotto, B., Gomes, L.C., 2010. Espécies nativas para piscicultura no Brasil, 2nd ed.. Editora da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil.

Basu, N., Todgham, A.E., Ackerman, P. A., Bibeau, M.R., Nakano, K., Schulte, P.M., Iwama, G.K., 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene* 295, 173-183.

- Bendhack, F., Peczek, V., Goncalves, R., Baldan, A. P., 2013. Desempenho do robalo-peva em diferentes temperaturas de cultivo. Pesquisa Agropecuária Brasileira 48, 1128-1131.
- Bermudes, M., Glencross, B., Austen, K., Hawkins, W., 2010. The effects of temperature and size on the growth, energy budget and waste outputs of barramundi (*Lates calcarifer*). Aquaculture 306, 160-166.
- Björnsson, B., Steinarsson, A., Oddgeirsson, M., 2001. Optimal temperature for growth and feed conversion of immature cod (*Gadus morhua* L.) ICES Journal of Marine Science 58, 29-38.
- Brandão, F.R., Gomes, L.C., Chagas, E.C., 2006. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. Acta Amazonica 36, 349-356.
- Cao, W.X., Chang, J.B., Qiao, Y., Duan, Z.H., 2007. Fish resources of early life history stages in Yangtze River. China Water Power Press, Beijing.
- Cerqueira, V.R., Mioso, R., Canarin, M., 2005. Indução de desova com fertilização natural e artificial e incubação de ovos do robalo-peva (*Centropomus parallelus*). Atlântica 27, 31-38.
- Colt, J., 2006. Water quality requirements for reuse systems. Aquacultural Engineering 34, 143-156.
- Currie, S., 2011. Heat shock proteins and temperature. In: Farrell, A.P, Cech, J.J., Richards, J.G, Stevens, E.D. (Eds). Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment. Elsevier, Amsterdam, pp. 1732-1737.
- Gilmore, R.G., Donahoe, C.J., Cooke D.W., 1983. Observations on the distribution and biology of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). Florida Scientist 46, 313-336.
- Gomes, L.C., Golombieski, J., Chippari-Gomes, A.R., Baldissotto, B., 2000. Biologia do Jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). Ciência Rural 30, 179-185.

Grigorakis, K., 2007. Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: a review. *Aquaculture* 272, 55-75.

He, Y., Wu, X., Zhu, Y., Li, H., Li, X., Yang, D., 2014. Effect of rearing temperature on growth and thermal tolerance of *Schizothorax* (Racoma) *kozlovi* larvae and juveniles. *Journal of Thermal Biology* 46, 24-30.

Hightower, L.E., 1991. Heat shock, stress proteins, chaperones and proteotoxicity. *Cell* 66, 191–197.

Imsland, A.K., Foss, A., Sparboe, L.O., Sigurdsson, S., 2006. The effect of temperature and fish size on growth and feed efficiency ratio of juvenile spotted wolffish *Anarhichas minor*. *Journal of Fish Biology* 68, 1107-1122.

Jobling, M., 1997. Temperature and growth: modulation of growth rate via temperature change. In: Wood, C.M., McDonald, D.G. (Eds.), *Global Warming: Implications for Freshwater and Marine Fish*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 225-572.

Katersky, R.S., Carter, C.G., 2005. Growth efficiency of juvenile barramundi, *Lates calcarifer*, at high temperatures. *Aquaculture* 250, 775-780.

Liebl, F., Amaral Jr., H., Garcia, S., Souto, L., Carvalho, C.V.A., Cerqueira, V.R., 2016. Desempenho de juvenis de robalo-flecha e robalo-peva submetidos a diferentes densidades de estocagem em água doce. *Boletim do Instituto de Pesca* 42, 145-155.

Mandarim-De-Lacerda, C.A., 2003. Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 75, 469-486.

Mello, G.L., Vieira, W.J., Correia, D., Emerenciano, M.G.C., Costa Filho, J., Tsuzuki, M.Y., 2014. Growth and survival of juvenile common snook *Centropomus undecimalis* at different temperatures and salinities in a recirculating aquaculture system. *Proceedings of the World*

Aquaculture Society 2014, Adelaide, Australia (June 7-11, 2014), p. 360. Available at <https://www.was.org/documents/WA2014AbstractBook.pdf>. Accessed: February 11, 2016.

Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9, 211-268.

Muller, R.G., 2000. The 2000 stock assessment update of common snook, *Centropomus undecimalis*. Florida Marine Fisheries Commission, Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Marine Research Institute. St. Petersburg, Florida, USA.

Nytrø, A.V., Vikingstad, E., Foss, A., Hangstad, T.A., Reynolds, P., Eliassen, G., Imsland, A.K., 2014. The effect of temperature and fish size on growth of juvenile lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). *Aquaculture* 434, 296-302.

Ostini, S., Oliveira, I.R., Serralheiro, P.C.S., Sanches, E.G., 2007. Criação do robalo-peva (*Centropomus parallelus*) submetido a diferentes densidades de estocagem. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 8, 250-257.

Passini, G., Carvalho, C.V.A., Landuci, F.S., Guinle, L., Sterzelecki, F., Cerqueira, V.R., 2013. Primeira experiência de maturação e desova do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*, em cativeiro no Brasil. *Proceedings of the XI Reunião Científica do Instituto de Pesca*, 2013, São Paulo, Brasil (April 8-10, 2013), p.143-145. Available at http://www.pesca.sp.gov.br/11recip2013/resumos/11a_ReCIP_R44_143-145.pdf. Accessed: May 06, 2016.

Piedras, S.R.N., Moraes, P.R.R., Pouey, J.L.O. F., 2004. Crescimento de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*), de acordo com a temperatura da água. *Boletim do Instituto de Pesca* 30, 177-182.

Rivas, L.R., 1986. Systematic review of the perciform fishes of the genus *Centropomus*. *Copeia* 3, 579-611.

Schmidt-Nielsen, K., 1997. *Animal physiology: adaptation and environment*, 5th ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Selye, H.A., 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138, 32.

Souza-Filho, J.J., Cerqueira, V.R., 2003. Influência na densidade de estocagem no cultivo de juvenis de robalo-flecha mantidos em laboratório. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38, 1317-1322.

Tucker Jr., J.W., 1987. Snook and tarpon culture and preliminary evaluation for commercial farming. *Progressive Fish-Culturist* 49, 49-57.

Tucker Jr., J. W., Jory, D.E., 1991. Marine fish culture in the Caribbean region. *World aquaculture* 22, 10-27.

Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiological reviews* 77, 591-625.

Wendelaar Bonga, S.E., 2011. Hormonal responses to stress. In: Farrell, A.P., Cech, J.J., Richards, J.G., Stevens, E.D. (Eds.), *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment*. Academic Press, San Diego, pp. 1515-1523.

5. REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ABBINK, W. et al. The effect of temperature and pH on the growth and physiological response of juvenile yellowtail kingfish *Seriola lalandi* in recirculating aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 330, p.130-135, 2011.

AIRAKSINEN, Susanna et al. Stressor-dependent regulation of the heat shock response in zebrafish, *Danio rerio*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 134, n. 4, p. 839-846, 2003.

ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L. et al. First basis for a sustained juvenile production technology of fat snook *Centropomus parallelus* Poey. **Hidrobiológica**, v. 14, n. 1, p. 37-45, 2004.

ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; TSUZUKI, M.Y. A review of methods for *Centropomus spp.*(snooks) aquaculture and recommendations for the establishment of their culture in Latin America. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 7, p. 684-700, 2008.

BARROSO, M.V. et al. Valor nutritivo de alguns ingredientes para o robalo (*Centropomus parallelus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.31, p.2157-2164, 2002.

BASU, N. et al. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. **Gene**, v. 295, n. 2, p. 173-183, 2002.

BASU, N.; KENNEDY, C.J.; IWAMA, G.K. The effects of stress on the association between hsp70 and the glucocorticoid receptor in rainbow trout. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 134, p. 655-663, 2003.

BENDHACK, F. et al. Desempenho do robalo-peva em diferentes temperaturas de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 1128-1131, 2013

BERMUDES, M. et al. The effects of temperature and size on the growth, energy budget and waste outputs of barramundi (*Lates calcarifer*). **Aquaculture**, v. 306, p. 160-166, 2010.

BRANDÃO, F.R. et al. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 3, p. 349, 2006.

CARPENTER, C.M.; HOFMANN, G.E. Expression of 70 kDa heat shock proteins in Antarctic and New Zealand notothenoid fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 125, p. 229–238. 2000

CARVALHO, M.O.X. **Idade e crescimento do robalo flecha, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) e robalo-peva, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) (*Osteichthyes: centropomidae*), no sudeste do Brasil**. 2006. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

CERQUEIRA, V. R.; MIOSO, R.; CANARIN, M. Indução de desova com fertilização natural e artificial e incubação de ovos do robalo-peva (*Centropomus parallelus*). **Atlântica**, v. 27, n. 1, p. 31-38, 2005.

CERQUEIRA, V.R.; TSUZUKI, M.Y. A review of spawning induction, larviculture, and juvenile rearing of the fat snook, *Centropomus parallelus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 1728, 2009.

CERQUEIRA, V.R. Cultivo de robalo-peva, *Centropomus parallelus*. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. (Orgs.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2010. p. 508-509.

CLARK, M.S.; PECK, L.S. HSP70 heat shock proteins and environmental stress in Antarctic marine organisms: a mini-review. **Marine genomics**, v. 2, n. 1, p. 11-18, 2009.

CORRÊA, C.F. et al. Frequência alimentar para juvenis de robalo-peva criados em água doce. **Rev. Acad., Cienc. Agrar. Ambient.**, v. 8, p. 429-436, 2010.

COSTA FILHO, J. et al. Uma revisão sobre os principais aspectos no cultivo do robalo. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 12, n. 3, p. 317-325, 2013.

DUBEAU, S.F. et al. Thermal shock of salmon in vivo induces the heat shock protein hsp 70 and confers protection against osmotic shock. **Aquaculture**, v. 168, n. 1, p. 311-323, 1998.

FEDER, M.E.; HOFMANN, G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annu. Rev. Physiol.**, v.61, p. 243-282, 1999.

FERRAZ, E.M.; CERQUEIRA, V.R. Influência da temperatura na maturação gonadal de machos do robalo-flecha, *Centropomus undecimalis*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.36, p.73-83, 2010.

FINK, A.L., GOTO, Y. **Molecular Chaperones in the Life Cycle of Proteins: Structure, Function, and Mode of Action**. New York: Marcel Dekker, 1998.

FRASCÁ-SCORVO, C.M.D.; CARNEIRO, D.J.; MALHEIROS, E.B. Comportamento alimentar do matrinxã (*Brycon cephalus*) no período de temperaturas mais baixas. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 27, n. 1, p. 1-5, 2001.

GEETHING, M.J; SAMBROOK, J. Protein folding in the cell. **Nature**, v. 355, p. 33–45, 1992.

GEORGOPOULOS, C.; WELCH, W.J. Role of major heat shock proteins as molecular chaperones. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 601-635, 1993.

GILMORE, R.G.; DONAHOE, C.J.; COOKE, D.W. Observations on the distribution and biology of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). **Florida Scientist**, v. 46, p. 313-336, 1983.

GOMES, L.C. et al. Biologia do Jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.

HAHN, G.M. et al. Mechanistic implications of the induction of thermotolerance in Chinese hamster cells by organic solvents. **Cancer Research**, v. 45, p. 4138–4143, 1985.

HE, Y. et al. Effect of rearing temperature on growth and thermal tolerance of *Schizothorax* (Racoma) *kozlovi* larvae and juveniles. **Journal of Thermal Biology**, v. 46, p. 24-30, 2014.

HENDRICK, J.P., HARTL, F.U. Molecular chaperone functions of heatshock proteins. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 62, p. 349–384, 1993.

HIGHTOWER, L.E. Heat shock, stress proteins, chaperones and proteotoxicity. **Cell**, v. 66, p. 191–197, 1991.

IWAMA, G.K. Stress in fish. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 851, n. 1, p. 304-310, 1998.

JIAN, C.Y., CHENG, S.Y., CHEN, J.C. Temperature and salinity tolerances of yellowfin sea bream, *Acanthopagrus latus*, at different salinity and temperature levels. **Aquaculture Research**, v. 34, n. 2, p. 175-185, 2003.

JOBLING, M. Temperature and growth: modulation of growth rate via temperature change. In: Wood, C.M.; McDonald, D.G. (Eds.). **Global Warming: Implications for Freshwater and Marine Fish**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. p. 225-572.

KATERSKY, R.S.; CARTER, C.G. Growth efficiency of juvenile barramundi, *Lates calcarifer*, at high temperatures. **Aquaculture**, v. 250, n. 3, p. 775-780, 2005.

KIANG, J.G.; TSOKOS, G.C. Heat shock proteins 70kDa: Molecular biology, biochemistry, and physiology. **Pharmacol. Ther.**, v. 80, p. 183–201, 1998.

KREGEL K. Invited Review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 5, p. 2177–2186, 2002.

LEVINE, A.J. et al. The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. **British Journal of Cancer**, v. 29, n. 3, p. 409-416, 1994.

Li, G.C.; HAHN, G.M. Ethanol-induced tolerance to heat and to adriamycin. **Nature**, v. 274, p. 699–701, 1978.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E.A. The heat-shock proteins. **Annual Review of Genetics**, v. 22, p. 631-677, 1988.

LODISH, H. et al. Protein structure and function. In: LODISH, H. et al. **Molecular Cell Biology**. 7ª ed. New York: W.H. Freeman and Co., 2003. p. 63-110.

MOMMSEN, T.P; VIJAYAN, M.M; MOON, T.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, p. 211-268, 1999.

MORIMOTO, R.I.; TISSIERES, A.; GEORGOPOULOS, C. (Eds.). **Stress Proteins in Biology and Medicine**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1990. 450 p.

MOURAD, N.M.N. **Crescimento Ponderal e morfométrico do pacu *Piaractus mesopotamicus*, tambaqui *Colossoma macropomum* e seus híbridos da primavera ao inverno**. 2012. 74 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA). **Potencial brasileiro**. Publicado em 18-06-2014. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/aquicultura/potencial-brasileiro>>. Acesso em: 10 agosto 2015.

MUKHOPADHYAY I.; SAXENA, D.K.; CHOWDHURI, D.K. Hazardous effects of effluent from the chrome plating industry: 70 kDa heat shock protein expression as a marker of cellular damage in transgenic *Drosophila melanogaster* (Hsp70-lacZ). **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 16, p. 1926-1932, 2003.

MULLER, R.G. **The 2000 stock assessment update of common snook, *Centropomus undecimalis***. St. Petersburg (Florida): Florida Marine Research Institute, 2000. 48 p.

NYTRØ, A.V. et al. The effect of temperature and fish size on growth of juvenile lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). **Aquaculture**, v. 434, p. 296-302, 2014.

OLIVEIRA, L.A.A.G. et al. Crescimento e produtividade de juvenis de robalo-peva a diferentes temperaturas e taxas de alimentação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 8, p. 857-862, 2013.

OSTINI, S. et al. Rearing of fat snook (*Centropomus parallelus*) at different stocking densities. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, p. 250-257, 2007.

PARRY, M.L. (Ed.). **Climate Change 2007**: impacts, adaptation and vulnerability. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

PELHAM, H.R.B. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. **Cell**, v. 46, p. 959-961, 1986

PIEDRAS, S.R.N.; MORAES, P.R.R.; POUHEY, J.L.O.F. Crescimento de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*), de acordo com a temperatura da água. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 30, n. 2, p.177-182, 2004.

PÖRTNER, H. Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. **Naturwissenschaften**, v. 88, n. 4, p. 137-14, 2001.

QUENNEVILLE, L.A. et al. p53 dependent regulation of heat shock protein 72. **British Journal of Dermatology**, v. 146, n. 5, p. 786-791, 2002.

RIVAS, L.R. Systematic review of the perciform fishes of the genus *Centropomus*. **Copeia**, v. 3, p. 579-611, 1986.

RUSSOTTI, G. et al. Induction of tolerance to hyperthermia by previous heat shock using human fibroblasts in culture. **Cryobiology**, v. 33, p. 567-580, 1996.

SOUZA-FILHO, J.J.; CERQUEIRA, V.R. Influência na densidade de estocagem no cultivo de juvenis de robalo-flecha mantidos em laboratório. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p.1317-1322, 2003.

SUN, L.; CHEN, H. Effects of water temperature and fish size on growth and bioenergetics of cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**, v. 426, p. 172-180, 2014.

TUCKER Jr., J.W.; LANDAU, M.P.; FAULKNER, B.E. Culinary value and composition of wild and captive common snook, *Centropomus undecimalis*. **Florida Scientist**, v. 48, p. 196-200, 1985.

TUCKER Jr., J.W. Snook and tarpon culture and preliminary evaluation for commercial farming. **Progressive Fish-Culturist**, v. 49, p. 49-57, 1987.

WELCH, W.J. How cells respond to stress. **Scientific American**, v. 268, n. 5, p. 56-64, 1993.

WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 3, p. 591-625, 1997.

WENDELAAR BONGA, S.E. Hormonal responses to stress. In: FARRELL, A.P. (Eds.). **Encyclopedia of fish physiology**: from genome to environment. San Diego: Academic Press, 2011. p. 1515-1523.